

# miR-30d 在温石棉恶性转化细胞中的异常表达及其靶基因生物信息学分析

李君贤 黄何菲 彭理 范岩鑫 张芳芳 朱丽瑾

杭州医学院公共卫生学院 卫生学研究所、职业病防治研究所 浙江杭州 310053

**【摘要】**目的 将间皮瘤差异表达基因与 miR-30d 下游靶基因比对得到的基因交集进行生物信息学分析,探究 miR-30d 在温石棉恶性转化细胞中的调控作用及对间皮瘤的影响。方法 利用温石棉慢性染毒人胸膜间皮细胞系 (MeT-5A) 构建的石棉转化细胞 (Asb MeT-5A) 模型,采用 qRT-PCR 检测转染了 miR-30d mimics 的细胞中 miR-30d 的表达水平,将 miR-30d 下游靶基因与间皮瘤差异表达基因比对得到的基因交集进行通路富集分析。结果 Asb MeT-5A+miR-30d 组细胞 miR-30d 表达水平较 Asb MeT-5A+miR-NC 组显著增高 ( $P < 0.01$ ); 筛选出的基因共 11 个,通过分析得到 miR-30d 主要参与 2 条通路,分别为肌动蛋白介导的细胞收缩和对生长因子的响应。结论 miR-30d 在温石棉恶性转化细胞中的表达量下降;生物信息学分析结果提示 miR-30d 在温石棉恶性转化细胞中的表达调控主要与肌动蛋白介导的细胞收缩和对生长因子的响应这两条通路有关,同时也提示这两个通路可能对间皮瘤的发生发展产生影响。

**【关键词】**miR-30d; 温石棉恶性转化; 间皮瘤; 生物信息学分析

石棉被国际癌症研究机构 (IARC) 列为 I 类致癌物,石棉进入肺内易蓄积而诱导肺癌和恶性间皮瘤等恶性肿瘤的发生<sup>[1]</sup>。温石棉属于石棉中的一种且它在发展中国家仍被广泛使用,温石棉的职业危害至少持续 20~50 年,间皮瘤病例的数量在未来几十年间将会增加<sup>[2]</sup>。为推动温石棉在全球范围内的禁用,需要更多证据证明温石棉的确切致癌性。恶性胸膜间皮瘤 (MPM) 是一种高度侵袭性肿瘤,本课题组前期利用温石棉慢性暴露人胸膜间皮细胞系 (MeT-5A) 构建体外细胞转化模型,提示温石棉在间皮细胞水平可能存在诱导间皮瘤的潜力<sup>[3]</sup>。间皮瘤是一种难治性癌症,探究温石棉致间皮瘤的发病机制对治疗间皮瘤具有重要意义。

microRNA (miRNA) 是由 20~24 个核苷酸组合成的单链非编码 RNA,在细胞增殖、凋亡和迁移等过程中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。miR-30d 是一种保守 miRNA,与非小细胞肺癌<sup>[5]</sup>等恶性肿瘤有关,而 miR-30d 在恶性间皮瘤中的作用并未阐明。因此,本研究利用温石棉恶性转化 MeT-5A (Asb MeT-5A),通过荧光定量 PCR 检测细胞中 miR-30d 的表达水平,并筛选 miR-30d 下游靶基因与间皮瘤差异表达基因比对得到基因交集,将其进行生物信息学分析,探究 miR-30d 对温石棉恶性转化细胞的调控机制,为

间皮瘤的诊断、治疗及预后指标提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 细胞株的购买与培养转化 前期研究已构建温石棉转化人胸膜间皮细胞 MeT-5A 细胞模型<sup>[3]</sup>。结果显示温石棉转化细胞组集落形成率明显高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),集落在软琼脂上生长,提示细胞恶性转化模型构建成功。

1.2 荧光定量 PCR (qPCR) 测定细胞 miR-30d 表达水平 测定在转染 6 h 后 Asb MeT-5A 细胞中 miR-30d 的表达水平。提取总 RNA,微量分光光度计测定 RNA 纯度和浓度。然后把总 RNA 进行逆转录和 qPCR 反应,在 37 °C 逆转录 60 min,85 °C 逆转录 5 min。miR-30d 的 PCR 引物序列是 5' -TGTTGTAACATCCCCGACTGGA-3', U6 的引物序列是 5' -CTCGCTTCGGCAGCACA-3',将装有样品的 PCR 板置于实时 PCR 仪上进行 PCR,预变性 (95 °C/30s) 和 40 个 PCR 循环 (95 °C/5s 和 60 °C/34s),内参基因为 U6,计算 miR-30d 的相对表达量,以上检测内容重复 3 次。

1.4 生物信息学分析 在美国国立生物技术信息中心开发的基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 筛选下载恶性间皮瘤组织样本

表达数据 GSE51024 进行后续分析。通过 miRWalk 网站、TargetScan8.0 网站和 miRDB 网站查询 miR-30d 下游靶基因，并与差异表达基因比对获得基因交集。将最终筛选出来的基因导入 matescape 进行在线分析，再使用 GO-BP ( Gene Ontology-Biological Process ) 以及 KEGG ( Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ) 本体来源对每个给定的基因列表进行通路和过程富集分析。

## 2 结果

2.1 miR-30d 在各组细胞中的表达差异结果 Asb MeT-5A+miR-30d 组细胞 miR-30d 表达水平较 Asb MeT-5A+miR-NC 组显著增高 ( P < 0.01 )。

见图 1

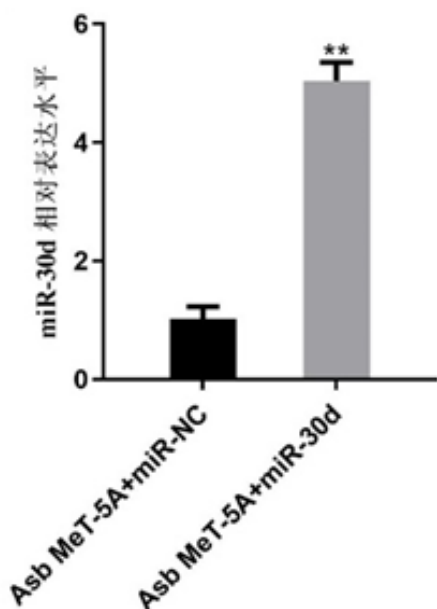


图 1 温石棉转化 MeT-5A 细胞中 miR-30d 的表达水平测定结果

2.2 生物信息学分析 GSE51024 数据筛选出差异表达基因 205 个，TargetScan8.0 网站显示 miR-30d 下游基因有 866 个，miRWalk 网站提示下游基因有 4995 个，三者取交集，筛选出的基因共 11 个 (见图 2)，分别为 GALNT3、TCF21、MAL、FBXO32、EPB41L5、ADAM12、NEDD4L、CALB2、MXRA5、ADAMTS3、LIMCH1。通过分析得到 2 条关键通路，分别为肌动蛋白介导的细胞收缩和对生长因子的响应。

## 3 讨论

本课题组前期研究结果显示在人恶性间皮瘤细胞 MSTO-211H、

NCI-H2452 中 miR-30d 表达下调<sup>[6, 7]</sup>。石棉已是熟知的 I 类致癌物质，间皮瘤的产生与职业环境暴露于石棉纤维密切相关，温石棉作为低毒性的一类石棉仍被大量使用，但是我们已从细胞水平证明了温石棉具有致间皮瘤的恶性转化潜能。本次研究 miR-30d 在温石棉恶性转化细胞中的差异表达，与 miR-30d 下游靶基因比对得到的基因交集进行通路富集分析，探究 miR-30d 对温石棉转化细胞的调控作用并在分子水平探讨 miR-30d 对间皮瘤的影响及其可能的发展机制。

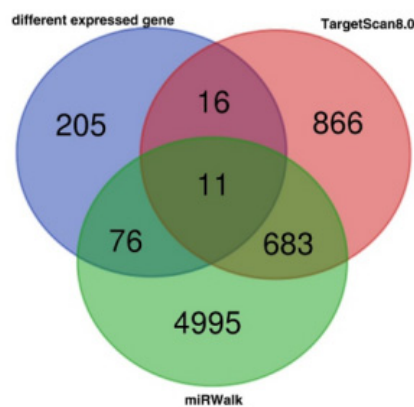


图 2 间皮瘤样本与正常组织样本差异表达基因，

miRWalk、TargetScan8.0 预测 miR-30d 下游基因交集韦恩图

通过生物信息学分析发现，间皮瘤差异表达基因和 miR-30d 下游靶基因的基因交集中，LIMCH1、NEDD4L、EPB41L5 基因参与肌动蛋白介导的细胞收缩通路。LIMCH1、EPB41L5 与细胞骨架重塑和伪足形成有关，LIMCH1、EPB41L5、NEDD4L 显著变化与肿瘤细胞侵袭和转移密切相关<sup>[8-10]</sup>，有研究发现，肌动蛋白聚合在石棉恶性转化致间皮瘤的过程中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。此外，GALNT3、MXRA5、EPB41L5 参与对生长因子的响应，GALNT3 可抑制肺癌细胞浸润<sup>[12]</sup>；MXRA5 在非小细胞肺癌中显著上调<sup>[13]</sup>。结合本次生物信息学分析和文献查阅的结果，再次提示间皮瘤的发生发展可能与肌动蛋白介导细胞收缩和对生长因子的响应等通路有关。除上述 5 个基因，在基因交集的其他 6 个可能的下游基因中，有关研究发现下调 FBXO32 可提高肺癌细胞的增殖与迁移能力<sup>[14]</sup>；ADAM12 上调可促进肺腺癌的迁移与侵袭<sup>[15]</sup>；CALB2 目前被认为是诊断人恶性间皮瘤最敏感的标志物<sup>[16]</sup>。查阅大量文献发现，6 个下游基因与胸膜恶性间皮瘤的研究较少。

结合 miR-30d 在 MeT-5A 细胞的差异表达、生物信息学分析结果和相关文献,我们大胆推测,miR-30d 可能是一个抑癌 miRNA,其表达下调可能参与间皮瘤的发生发展过程,根据生物信息学分析结果可推测出,miR-30d 可能通过调控肌动蛋白介导的细胞收缩和对生长因子的响应的通路影响间皮瘤的发生发展,该结论还需进一步实验进行验证。鉴于本次研究对间皮瘤更具体的发生发展机制研究的有限性,本课题组将深入探究和验证间皮瘤的发病机制,为间皮瘤的预防措施、治疗靶标及预后指标提供初步线索。

#### 参考文献:

- [1]MUTETWA B, MOYO D, BROUWER D. Prediction of Asbestos-Related Diseases ( ARDs ) and Chrysotile Asbestos Exposure Concentrations in Asbestos-Cement ( AC ) Manufacturing Factories in Zimbabwe [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 20 ( 1 ) .
- [2]FERRANTE D, MIRABELLI D, SILVESTRI S, et al. Mortality and mesothelioma incidence among chrysotile asbestos miners in Balangero, Italy: A cohort study [J]. *Am J Ind Med*, 2020, 63 ( 2 ) : 135-45.
- [3]张芳芳, 苑修源, 高雅楠, et al. 温石棉诱导 MeT-5A 细胞恶性转化的研究 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2021, 39 ( 02 ) : 105-9.
- [4]PELLETIER D, RIVERA B, FABIAN M R, et al. miRNA biogenesis and inherited disorders: clinico-molecular insights [J]. *Trends Genet*, 2023.
- [5]WU Y, ZHANG J, HOU S, et al. Non-small cell lung cancer: miR-30d suppresses tumor invasion and migration by directly targeting NFIB [J]. *Biotechnol Lett*, 2017, 39 ( 12 ) : 1827-34.
- [6]U L, WU W, YIN X, et al. miR-30d is related to asbestos exposure and inhibits migration and invasion in NCI-H2452 cells [J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7 ( 10 ) : 1469-79.
- [7]苑修源, 张芳芳, 黄雅丽, et al. microRNA-30d 对人恶性胸膜间皮瘤细胞 MSTO-211H 增殖和迁移以及侵袭的抑制作用 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2021, 39 ( 2 ) : 99-104.
- [8]ZHANG R, ZHANG W, ZENG Y, et al. The regulation of C PNE1 ubiquitination by the NEDD4L is involved in the pathogenesis of non-small cell lung cancer [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7 ( 1 ) : 336.
- [9]WU D, DENG S, LI L, et al. TGF-beta1-mediated exosomal lnc-MMP2-2 increases blood-brain barrier permeability via the miRNA-1207-5p/EPB41L5 axis to promote non-small cell lung cancer brain metastasis [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 ( 8 ) : 721.
- [10]BERSINI S, LYTLE N K, SCHULTE R, et al. Nup93 regulates breast tumor growth by modulating cell proliferation and actin cytoskeleton remodeling [J]. *Life Sci Alliance*, 2020, 3 ( 1 ) .
- [11]MACPHERSON M, WESTBOM C, KOGAN H, et al. Actin polymerization plays a significant role in asbestos-induced inflammasome activation in mesothelial cells in vitro [J]. *Histochem Cell Biol*, 2017, 147 ( 5 ) : 595-604.
- [12]PARK M S, YANG A Y, LEE J E, et al. GALNT3 suppresses lung cancer by inhibiting myeloid-derived suppressor cell infiltration and angiogenesis in a TNFR and c-MET pathway-dependent manner [J]. *Cancer Lett*, 2021, 521: 294-307.
- [13]何毅. MXRA5 和 CXCR4 在非小细胞肺癌中的作用及机制研究 [J]. 2017.
- [14]ZHANG N, LIAO Y, LV W, et al. FBXO32 targets PHPT1 for ubiquitination to regulate the growth of EGFR mutant lung cancer [J]. *Cell Oncol ( Dordr )*, 2022, 45 ( 2 ) : 293-307.
- [15]PAN J, HUANG Z, ZHANG Y, et al. ADAM12 as a Clinical Prognostic Indicator Associated with Tumor Immune Infiltration in Lung Adenocarcinoma [J]. *DNA Cell Biol*, 2022, 41 ( 4 ) : 410-23.
- [16]BLUM W, PECZE L, RODRIGUEZ J W, et al. Regulation of calretinin in malignant mesothelioma is mediated by septin 7 binding to the CALB2 promoter [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18 ( 1 ) : 475.

基金项目:浙江省省级大学生创新创业训练计划项目(S202313023105);浙江省自然科学基金(LQY18H260001、LGD21C040008);杭州医学院院所专项计划项目(YS2022012、YS2021013)资助的课题

\*通讯作者:朱丽瑾